

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato
hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob
diferentes condições de armazenamento**

Fernanda Voigt Mota

Pelotas, fevereiro 2014

FERNANDA VOIGT MOTA

Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Veterinária Preventiva).

Orientador: Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, fevereiro 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M917e Mota, Fernanda Voigt

Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *schinus terebinthifolius raddi* sob diferentes condições de armazenamento / Fernanda Voigt Mota ; Luiz Filipe Damé Schuch, orientador. — Pelotas, 2014.

38 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Aroeira vermelha. 2. Liofilizado. 3. Ação antibacteriana. I. Schuch, Luiz Filipe Damé, orient. II. Título.

CDD : 636.089

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Prof. Dr. Fabrício da Fonseca Barbosa

Prof. Dra Silvia Regina Leal Ladeira

Prof. Dra. Marlete Brum Cleff

Prof Dr João Zani (Suplente)

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha mãe,
meu grande exemplo, e a minha irmã por sempre
me apoiarem, e por tornarem o caminho
mais simples e os obstáculos mais fáceis de superar
e por estarem sempre ao meu lado.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por permitir a realização de mais um projeto, e pela proteção dispensada em todos os momentos.

À minha querida mãe, Marizet, por ser um exemplo de força e coragem. Por todo apoio e ajuda dada em todos os momentos. Meu amor e eterna gratidão pelos ensinamentos, conselhos, cuidados e presença diária, mesmo em pensamentos e orações. Sobretudo obrigada por sua amizade, amor e por sempre confiar em mim.

Ao meu orientador prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch pela orientação concedida, apoio e confiança que me foi depositada, além das oportunidades proporcionadas durante esses dois anos de trabalho. Muito obrigada prof. Schuch.

As colegas, integrantes do Laboratório de Doenças Infecciosas principalmente as colegas, Anna, Katiúscia, Carolina, Diane, Ângela, Roberta, Lisiane, Bianca, Silvia, Renata e Carla, que sempre me ajudaram tanto com o aprendizado em rotina de laboratório como na execução dos experimentos.

A todos que participaram da minha vida, em todas as intensidades.

“O conhecimento nos faz responsáveis”.

Che Guevara

Resumo

MOTA, Fernanda Voigt . **Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento.** 2014. 40f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As plantas medicinais têm sido o recurso tradicional mais importante do homem para tratar infecções microbianas, e constituem uma importante fonte na busca de novos fármacos com atividades terapêuticas. A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) pertence à família *Anacardiaceae*, é uma espécie nativa da América Central e do Sul. Possui ação antimicrobiana, antiinflamatória e antiulcerogênica, sendo utilizada como antisséptico e no tratamento de estomatites. E a medicina veterinária vem se apropriando do conhecimento das práticas populares utilizadas para o tratamento ou prevenção das doenças que acometem os animais. Com isso também cresce a necessidade de estudos referentes a eficiência, qualidade e segurança de fitoterápicos. Nessa perspectiva, esse estudo se propôs a avaliar a estabilidade da ação antibacteriana ao longo do tempo do extrato hidroalcoólico das folhas desta planta em diferentes condições de armazenamento, frente a cinco bactérias relacionadas a mastite bovina (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus* ATCC e uma cepa de *Staphylococcus* spp coagulase positiva).. A atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da folha de Aroeira, foi testada pela técnica de microdiluição serial em placas. Os resultados foram expressos pela Concentração Bactericida Mínima. Os extratos de aroeira demonstraram que a CBM no tempo zero, diferiu das demais ao longo do tempo de análise, apresentando melhor atividade antibacteriana, independente da condição de armazenamento. Já a temperatura de geladeira favoreceu a atividade antibacteriana tanto dos extratos que passaram por rotaevaporador (extraídos), como os (Não Pré-extraídos) após seis meses de observação. Nas condições do experimento pode-se concluir que houve pouca influência da variável tempo na atividade antibacteriana dos extratos durante os seis meses do experimento. Por outro lado, a liofilização tendeu a ser a melhor forma de armazenamento para o extrato.

Palavras-chave: Aroeira-vermelha. Liofilizado. Ação antibacteriana.

Abstract

MOTA, Fernanda Voigt . **Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento** 2014. 40f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Medicinal plants have been the most important traditional resource man to treat microbial infections , and constitute an important source in the search for new drugs with therapeutic activities . The pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) belongs to the *Anacardiaceae* family, is a species native to Central and South America has antimicrobial , anti-inflammatory and anti-ulcer action, being used as an antiseptic and in the treatment of stomatitis . And veterinary medicine is becoming more and more aware of the popular methods used for the treatment or prevention of diseases affecting animals . With this too grows the need for studies on the efficiency , quality and safety of herbal medicines. In this perspective , this study aimed to evaluate the stability of the antibacterial action over time of the hydroalcoholic extract of the leaves of this plant under different conditions of storage, front five bacteria that cause bovine mastitis . The antibacterial activity of the aqueous leaf extract Aroeira technique was tested by serial microdilution techniques against five bovine mastitis bacteria (*Streptococcus agalactiae* , *S. dysgalactiae* , *S. uberis* , *Staphylococcus aureus* ATCC and one strain of *Staphylococcus* spp coagulase-positive) . The results were expressed as Minimal Bactericidal Concentration . The extracts of mastic showed that CBM at time zero , differed from the others over time of analysis , showing better antibacterial activity , regardless of storage conditions . Have at refrigerated temperatures favored the antibacterial activity of both extracts that have undergone rotaevaporator (extracted) , how (not pre - extracted) after six months of observation . Under the conditions of the experiment it can be concluded that there was little influence of time on the antibacterial activity of the extracts during the six months of the experiment . Moreover , lyophilization tended to be the best form for storage extract

Key words: Brazilian pepper tree. Stability. Antibacterial action.

Lista de Figuras

ARTIGO 1 Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento

Figura 1 Exemplar de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) localizada no município de Capão do Leão/RS22

Figura 2 Esquema ilustrando o preparo e as condições de armazenamento dos extratos.....24

Lista de Tabelas

ARTIGO 1 Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento

Tabela 1 Determinação do pH dos extratos de <i>Schinus terebinthifolius</i> em diferentes formas de armazenamento.....	27
Tabela 2 Modelo de análise de variância (variável dependente: bactéria)	27
Tabela 3 Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) de CBMajustada para tempo.....	28
Tabela 4 Teste de comparação de médias (Tukey HSD com $p < 0,05$) de CBM ajustada para armazenamento.....	28

Lista de Abreviaturas

% – porcentagem

°C – graus Celsius

°gl – Graus Gay-Lussac

µL – microlitros

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain heart infusion

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBM – Concentração Bactericida Mínima

DVP – Departamento de Veterinária Preventiva

EHA – Extrato hidroalcoólico

FV – Faculdade de Veterinária

g/L – Gay-Lussac

Km – Kilometros

L – litro

M – metros

mL – mililitro

mm/Hg – milímetros de mercúrio

n° – número

OMS – Organização Mundial de Saúde

RPM – Rotação por minuto

SCP – *Spathylococcus* spp. coagulase positiva

spp – espécie

UFC – Unidades formadoras de colônias

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos.....	18
3. Artigo	19
3.1 Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi sob diferentes condições de armazenamento.....	20
4. Conclusão geral	29
5. Referências	32

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios das civilizações, os vegetais vem sendo utilizados não só para a alimentação, mas também como fonte medicamentosa. São inúmeras as enfermidades tratadas com chá, infuso, decocto, macerado, sucos, tinturas, banhos, bem como cataplasmas e unguentos, preparados a partir de partes de plantas (CALIXTO, 2001).

O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi no início meramente intuitivo ou, pela observação dos animais quando doentes que buscavam nas ervas, a cura para as suas afecções (Oliveira & Silva, 1994). Toda a sociedade humana acumula acervo de informações sobre o ambiente que a cerca, que vai lhe possibilitar interagir com ele para promover suas necessidades de sobrevivência (AMOROSO, 1996).

O Brasil possui uma Farmacopéia popular diversa, baseada em plantas medicinais, resultado de uma miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas. Além disso, o país possui a maior diversidade vegetal do planeta, aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores (ENGELKE 2003).

Di Stasi (1996) cita que no Brasil, cerca de 20% de nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico.

O tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais, ou seus derivados, é uma prática antiga e que atualmente encontra-se em expansão por todo o mundo. A pesquisa de substâncias antimicrobianas nos vegetais desenvolveu-se mais após a descoberta da penicilina.

As plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características edafo-climáticas, além do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas são características de uma

Também na atenção primária e secundária em Medicina Veterinária, o estudo e a utilização da medicina tradicional vêm ganhando espaço. A produção de alimentos de origem animal nas modernas criações baseia-se no uso em larga escala de produtos químicos de alto custo e que resultam em resíduos nos alimentos com potencial risco a saúde dos consumidores (SCHUCH, 2007).

Na tentativa da manutenção da produtividade, começam a aparecer na literatura publicações que buscam validar saberes tradicionais utilizando extratos de plantas medicinais em substituição aos antibióticos e outros químicos convencionais utilizados na moderna produção animal.

Como consequência da grande difusão e utilização das plantas medicinais, as indústrias vêm produzindo produtos à base de espécies vegetais, de diversas formas farmacêuticas, que têm sido comercializados em farmácias, supermercados e casas de produtos naturais. Contudo, não há garantia para a grande maioria desses produtos, quanto à sua eficácia, segurança e qualidade.

A segurança e a eficácia dos produtos dependem de diversos fatores, dentre estes podemos destacar a qualidade do produto comercializado. Segundo Farias (2001), a eficácia é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos, e a segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos. Assim, a má qualidade de um produto fitoterápico ou droga vegetal pode vir a anular a sua eficácia e trazer riscos à saúde do consumidor.

Entende-se por qualidade, o conjunto de critérios que caracterizam uma matéria-prima para o uso ao qual se destina.

Apesar do desenvolvimento de inúmeros métodos confiáveis de isolamento, elucidação e quantificação para a análise de fitoconstituintes, os referenciais de padronização em plantas medicinais deixam ainda a desejar, e esta insuficiência informativa se deve ao fato da grande variabilidade de composição química em determinada espécie, manejo agrícola, fatores intrínsecos e extrínsecos, durante as diversas fases de seu processamento.

Por outro lado ainda são escassas as informações sobre a estabilidade e conservação de extratos, embora procedimentos como autoclavagem e congelamento sejam comumente utilizados.

Durante os processos extrativos, a variabilidade de constituintes químicos detectados numa planta, seja quantitativo ou qualitativo, depende de muitos fatores. O ambiente físico, através dos estímulos proporcionados pelo meio, fatores genéticos, condições de secagem e estocagem são as determinantes do acréscimo, diminuição ou até ausência de determinados metabólitos secundários bioativos (MITSCHER, 2005).

A temperatura utilizada no processo de secagem do material vegetal pode agir alterando os teores dos metabólitos de interesse (CALIXTO, 2000), existem faixas de temperatura ideal para determinada plantas, mas sendo preferível utilizar altas temperaturas de secagem a fim de inibir a ação de enzimas e a atividade microbiana (MING, 1994). Tanto o processo de secagem quanto o de armazenamento podem promover rearranjos, oxidações e reduções das moléculas bioativas, levando à perda de qualidade do produto fitoterápico.

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID et al., 2004). Tal substância não necessariamente apresenta a atividade farmacológica esperada ou para a qual o extrato é empregado.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

A ANVISA disponibiliza um guia para realização de estudos de estabilidade, contido na Resolução nº.1 de 2005 (Brasil, 2005), a qual contempla diretrizes para estudos de estabilidade acelerada, estabilidade de acompanhamento e estabilidade

de longa duração, seja para medicamentos alopáticos ou mesmo fitomedicamentos. Estes estudos abrangem um conjunto de testes projetados para se obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas.

A estabilidade acelerada representa o estudo no qual a degradação química ou mudanças físicas de um produto são aceleradas em condições forçadas de armazenamento. A estabilidade de longa duração contempla um estudo projetado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade esperado e, opcionalmente, após seu vencimento. Já na estabilidade de acompanhamento o estudo é realizado após o início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, previstas nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou extratos brutos da droga vegetal. Esses aspectos são fundamentais para a transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico, havendo a necessidade de estudos de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e, sobretudo, da atividade farmacológica a ser explorada. Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (TOLEDO et al., 2003; SONAGLIO et al., 2007).

Muitos dos trabalhos com plantas medicinais são desenvolvidos em função de informações terapêuticas obtidas à partir da medicina popular, porém estudos multidisciplinares, envolvendo o conhecimento químico, atividade biológica e o controle tecnológico de qualidade da droga vegetal e de seus extratos são importantes para a consolidação da fitoterapia como prática segura e eficaz.

Extratos vegetais secos por aspersão têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (VASCONCELOS

et al., 2005). Apesar da forma fluida dos extratos ser a mais comumente comercializada, somente após a retirada de parte do líquido extrator é que as formulações sólidas, semi-sólidas ou líquidas podem ser preparadas. Porém, se a eliminação do solvente não for realizada corretamente pode-se provocar a perda de constituintes químicos do extrato.

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação em seu recipiente específico ou sistema fechado de permanecer, no prazo de validade, dentro das especificações físicas, químicas, microbiológica, terapêutica e toxicológica (VADA, 1995; LUSINA et al., 2005).

Segundo a *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*, o teste de estabilidade é um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. A estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto.

Variáveis relacionadas à formulação, fabricação, acondicionamento do material e as condições ambientais e de transporte podem afetar a estabilidade do produto (ANVISA, 2004). Além de fatores extrínsecos, referentes ao tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento e vibração.

O estudo da estabilidade de um produto contribui para auxiliar no monitoramento organoléptico, físico-químico e microbiológico, produzindo informações confiáveis e seguras sobre o produto.

1.1- Aroeira (*Schinus terebinthifolius*)

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido significativo nos últimos tempos, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia desagradável.

Schinus terebinthifolius (Aroeira Vermelha), é uma planta pertencente à família Anacardiaceae, arbórea de porte médio, aromática, amplamente, utilizada na

culinária (LENZI & ORTH, 2004) e no paisagismo urbano sendo nativa da América Latina, abrangendo principalmente Argentina, Chile e Brasil. No Brasil, ela ocorre principalmente ao longo da mata atlântica, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, é popularmente conhecida como aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-pimenteira, aroeira-mansa, aroeira-vermelha ou pimenta-rosa. É usada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como febres, ferimentos e reumatismos.

Em análise fitoquímica, verificou-se alto teor de taninos, biflavonóides e ácidos triterpênicos presentes na casca e de 5% do óleo essencial formado por mono e sesquiterpenos nas folhas e frutos (LORENZI & MATOS, 2008).

Pesquisas utilizando a Aroeira revelam que a planta apresenta propriedades cicatrizantes (LUCENA et al, 2006; LIPINSKI, 2008), anti-inflamatória (AMORIM & SANTOS, 2003), antibacteriana (GUERRA et al, 2000; AMORIM & SANTOS, 2003; DEGÁSPARI et al, 2005; SANTOS, 2007; SOARES et al 2007; LIPINSKI, 2008) e antifúngica (SANTOS et. Al, 2010; GUERRA et.al, 2000).

1.2 Mastite Bovina

Mastite é a inflamação da glândula mamária da vaca, sendo considerada a principal afecção de bovinos destinados a produção leiteira (LANGONI et al., 2011). Geralmente determinando redução na produção de leite, perdas pelo descarte e morte de animais, e custos com tratamento (SCHUCH et al., 2008). A doença pode ser provocada por diversos agentes, dentre eles, bactérias, vírus, algas e fungos. As bactérias são os agentes de maior importância como causa da doença, principalmente as pertencentes ao gênero: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. (OYARZABAL et al., 2011). Sua ocorrência envolve três fatores principais: a resistência da vaca, o agente patogênico e o ambiente. No entanto, podem ser controlados por medidas higiênicas e profiláticas (SCARLATELLI, 1998). Como medida de prevenção dessa enfermidade, se encontram a higienização do ambiente, dos equipamentos e a antissepsia do úbere

após a ordenha, o qual reduz o número de microrganismos patogênicos (MOTA et al., 2011).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008, autoriza o uso de extratos vegetais na sanitização de equipamentos e instalações e também no tratamento e prevenção de enfermidades dos animais na produção orgânica (BRASIL, 2008). Com isso ultimamente tem crescido o interesse científico na pesquisa de plantas utilizadas na medicina popular, uma possível alternativa na substituição ao uso de desinfetantes e anti-sépticos químicos-convencionais.

Diversos são os estudos com plantas medicinais com atividade antibacteriana em busca de tratamento e prevenção da mastite. Pesquisas com a Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para comprovação de sua efetividade referente a ação antibacteriana, mostram que tanto as folhas como os frutos possuem ação bactericida contra as principais bactérias relacionadas a mastite bovina (FACCIN, 2013).

Todos esse requisitos revelam a necessidade da realização de mais estudos com os extratos dessa planta. Estudos mais profundos sobre seus princípios ativos, análises de durabilidade de extratos e da manutenção de sua atividades antimicrobiana durante o armazenamento.

Os extratos serão então, submetidos a estudo de estabilidade, a partir das suas característica físico-químicas e biológicas, tempo de permanência em prateleira. Verificando semelhanças e/ou diferenças entre essas preparações e verificar as alterações sofridas com o tempo, de forma a contribuir na sua efetividade e no controle de qualidade.

2 OBJETIVOS

2.1-Objetivo geral

- Verificar a estabilidade dos compostos ativos dos extratos de *Schinus terebinthifolius*, através da ação antimicrobiana da planta.

2.2- Objetivos Específicos

- Determinar alterações do pH dos extratos
- Identificar a ocorrência de interferência na atividade biológica devido ao tempo de conservação dos extratos.
- Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoolicos conservados em solução e liofilizados de *Schinus terebinthifolius*

3 ARTIGO

Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi sob diferentes condições de armazenamento

Fernanda Voigt Mota, Katiúscia Barbosa Bilhalva, Anna Beatriz Pizarro Chaffe, Luiz Filipe Damé Schuch, Ângela Faccin, Diane Bender Almeida Schiavon.

Irà submeter à revista: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Mediciniais e Aromáticas

Estabilidad de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi bajo diferentes condiciones de almacenamiento

Stability of the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi
under different storage conditions

Fernanda Voigt Mota¹, Katiúscia Barbosa Bilhalva², Anna Beatriz Pizarro Chaffe³, Luiz Filipe Damé Schuch⁴, Ângela Faccin³, Diane Bender Almeida Schiavon³.

1Mestranda en Veterinaria, Facultad de Veterinaria - UFPel

2Doutoranda en Ciencias Veterinarias - UFRGS

3Doutoranda en Veterinaria - Facultad de Veterinaria- UFPel

4 Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria- UFPel
nandavoight@yahoo.com.br

Abstract

The objective of this study was to evaluate the stability of the antibacterial action of the hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi in different storage conditions. The work was performed by the microdilution technique in serial plates using alcoholic extract (extracted and not pre-extracted) stored at temperatures (room, refrigerator, freezing) and freeze-ahead to five bacteria that cause bovine mastitis. The extracts of mastic showed that CBM at time zero, differed from the others over time of analysis, showing better antibacterial activity, regardless of storage conditions. Have at refrigerated temperatures favored the antibacterial activity of both extracts that have undergone rotaevaporator (extracted), how (not pre-extracted) after six months of observation.

Keywords: Brazilian pepper tree., lyophilized, antibacterial activity

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad de la acción antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi en diferentes condiciones de almacenamiento. El trabajo se realizó mediante la técnica de microdilución en placas en serie utilizando extracto alcohólico (extraído y no pre-extrae) se almacena a temperaturas (ambiente, refrigerador, congelación) y la congelación de la ventaja a cinco bacterias que causan la mastitis bovina. Los extractos de masilla mostraron que la CBM en el tiempo cero, difería de los otros en el tiempo de análisis, que muestra mejor actividad antibacteriana, independientemente de las condiciones de almacenamiento. Tener a temperaturas de refrigeración favorecido la actividad antibacteriana de los dos extractos que han sido objeto rotaevaporator (extraído), cómo (no pre-extraído) después de seis meses de observación.

Palabras clave: Red Aroeira, liofilizado, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Schinus terebinthifolius Raddi es una planta nativa de Brasil y en toda América del Sur, perteneciente a la familia Anacardiaceae, es común en la vegetación costera (Nunes et al, 2006; . Ribas et al, 2006) . Popularmente conocida como la pimienta - masilla de color rojo o rosa (Roveda et al. , 201) . Muchas de las propiedades médicas se han atribuido a estas plantas, además de su uso como plantas ornamentales, todas las partes de la planta se han utilizado en la medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades (Bendaound et al,2010) .

El uso de plantas con fines medicinales desde hace siglos constituyó la base de la práctica médica terapéutica (Blanco -Neto et al. , 2006) . Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80 % de la población mundial, utiliza de alguna manera las plantas medicinales como la (Lucena et al.,2006).

El creciente interés de la comunidad científica por la medicina a base de hierbas en las últimas dos décadas, llevó al desarrollo de varias prácticas y refranes (Santos et al. , 2006) basados en la investigación. También en la atención primaria y secundaria en la medicina veterinaria, el estudio y el uso de plantas y hierbas medicinales están ganando espacio. La mastitis es la principal condición de ganado bovino para la producción de leche (Langoni et al. , 2011) . Es causada principalmente por agentes bacterianos, que son más frecuentes los que pertenecen a los géneros : .*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. y *Corynebacterium* spp. (Oyarzabal et al. , 2011) . Es un problema importante en los hatos lecheros de afectar la salud de los animales, reducir la producción y causar cambios significativos en la calidad de la leche (Zafalon et al. , 2008). Además de la disminución en la pérdida de la producción y calidad de la leche, hay una pérdida de la función de parénquima glandular, hacer una reserva de los agentes patógenos de la ubre (Reis et al 2003).

El estudio de estabilidad es muy importante para cualquier producto farmacéutico, ya que es posible determinar las condiciones de almacenamiento y uso período en el que el producto mantiene sus características iniciales, garantizar la seguridad y la eficacia durante un período determinado. . El objetivo de este estudio es evaluar la potencia de la acción antibacteriana de *Schinus terebinthifolius* Raddi extrae mediante la comprobación de pH y actividad antibacteriana, cuando se someten a diferentes tipos de almacenamiento y tiempo de residencia en el estante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y secado de plantas

Las hojas se recogen en enero de 2013 por la mañana, 09 a.m.-10 a.m. . Los árboles que proporcionaron el material vegetal para el experimento, que se encuentra en el Campus Capon León, la Universidad Federal de Pelotas, en el municipio Capon León, Rio Grande do Sul, en un radio de 1 km de las referencias geográficas 31 ° 48 ' S y 52 ° 24 ' W, altura promedio de 17m. Las plantas tenían apariencia saludable y sin enfermedad o la herbivoría.

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Bacteriología (DVP / FV / UFPel) donde se realizó la separación manual de las ramas y los tallos dejando solo las hojas. Las hojas se mantuvieron durante dos semanas en las pantallas de secado a la sombra y un lugar seco, protegido de los insectos y otros animales.

Los especímenes de herbario de cada árbol se enviaron para su identificación y la conservación en el Herbario del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Pelotas.



Figura 1 Muestra de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), ubicado en el término municipal de Capão do Leão / RS.

Preparación de la solución madre de los extractos

El extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi se preparó en una proporción de 1:10 (g / ml) de hojas de la planta con alcohol de grano a una densidad de 70 ° GL . La planta estaba en contacto con el alcohol durante quince días , con manual de agitar dos veces al día . Después de este período, la filtración se realizó con cuatro pliegues del filtro de gasa, restablecer el volumen inicial con alcohol de grano 70 ° GL y se almacena en una botella de color ámbar en la oscuridad (Farmacopea Brasileña 1988 Schiavon et al. , 2011).

Las condiciones de almacenamiento en la prueba

Los métodos de almacenamiento que se presentaron extractos fueron los siguientes:

a . Extractos hidroalcohólicos – Extracto

Los extractos hidroalcohólicos eran extraídos en un evaporador rotatorio y se someten a una rotación de aproximadamente 30 rpm , con una temperatura máxima de 56 ° C bajo presión negativa 600 mm / Hg , en el tiempo suficiente para extraer al menos 70 % del volumen de esperaba alcohol después de que se mantuvieron bajo tres condiciones de almacenamiento diferentes: refrigerador (4-10 ° C), congelador (-10 ° C) .

b. Extractos Liofilizados

Después de la extracción en un evaporador rotatorio , la solución acuosa obtenida se fraccionó en cada viales de 5 ml , congelado en Ultrafreezer (-70°C) durante 72 h y se sometió a secado por congelación a una presión de aproximadamente 130 mm de Hg de vacío con la temperatura del condensador -50°C . A continuación , se almacenaron en un refrigerador . Para utilizar el extracto fue rehidratada .

c . Extractos hidroalcohólicos - No Pre- Extraídas

Los extractos hidroalcohólicos no extraídos se mantuvieron en un evaporador rotatorio bajo tres condiciones diferentes de almacenamiento : Temperatura de temperatura de 18°C (mínimo $10,7$ y un máximo de $28,3^{\circ}\text{C}$) significa , dividido en dos alícuotas , una de mantenido en presencia de la luz sobre la mesa de laboratorio , y el otro en la ausencia de luz en la nevera y congelar como se describe anteriormente.



Figura 2: Esquema que ilustra las condiciones de preparación y almacenamiento de los extractos.

Parámetros analizados

Determinación del Ph

Determinado directamente pHmetro , marca Aaker , modelo MPA- 210 , previa verificación del aparato con las lecturas de las soluciones tampón ($\text{pH} = 4,0$ y $\text{pH} = 7,0$). La determinación de pH se realizó utilizando muestras de 10 ml de los extractos.

Determinación de la actividad biológica

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el desafío son : *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600),

Staphylococcus coagulasa positiva , *Streptococcus agalactiae* , *S. dysgalactiae* y *S. uberis* , estos microorganismos asociados con la mastitis bovina . Todas las muestras procedentes de la rutina del Laboratorio de Diagnóstico Regional, Facultad de Veterinaria, UFPel, y caracterizado según Quinn et al. (1998).

Suspensión de microorganismos (inóculo)

Inóculos bacterianos se prepararon a una concentración de $10^5 - 10^6$ de UF / ml de BHI en 2x Acumedia ® para la prueba. La concentración se ajustó a Escala Macfarland, con diluciones , para obtener la escala deseada .

Caldo de microdilución

Los extractos de plantas se probaron usando la prueba de microdilución en caldo para determinar la concentración bactericida mínima (CBM) . 96 pozos de fondo plano estéril se utilizó para esta prueba. Diluciones sucesivas del extracto en la base 2 se realizaron con multicanal , con agua estéril como diluyente pipeta . Poco después, todos los agujeros estaban llenos de 100 μ L de inóculo bacteriano preparado en BHI Acumedia ® de doble concentrado . Las microplacas se incubaron en incubadora bacteriológica a 36 ° C durante 24 horas . Después de este intervalo de tiempo , una parte alícuota se retiró para 5 μ l de cada uno de los orificios y se subcultivaron en placas de agar sangre que contenían Petry Acumedia ® más 5 % de sangre de oveja Entonces las placas se incubaron durante 24 horas a 36 ° C. Las pruebas se realizaron por triplicado y el CBM se define por la media geométrica del recíproco de la dilución de los extractos en los que no fue posible recuperar microorganismos en el subcultivo (Prestes , 2008 ; OYARZABAL , 2011) .

Diseño y análisis de los resultados experimentales

Las diferentes formas de tratamientos de almacenamiento se mantuvieron durante 168 días en las condiciones descritas . A los 0, 7 , 14 , 28 , 56 , 84 , 112 , 140 y 168 días , se recogieron alícuotas de cada tratamiento para la evaluación de las características físico- químicas (pH y la materia seca) y biológica (potencia de la actividad antimicrobiana) de los extractos verduras. Análisis descriptivo de los parámetros físico-químicos se realizaron con el programa Excell . Los resultados de CBM se compararon estadísticamente usando 9,0 paquete Statistix , utilizando un modelo de AOV/ AOCV sólo donde la variable dependiente se expresa como la diferencia de los logaritmos de CBM calculados en diferentes momentos y que se encuentra en el día 0 para cada tratamiento . El tiempo de almacenamiento , tipo de almacenamiento variable y extracción fueron las variables independientes y la bacteria se introdujo en el modelo como covariable.

RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la acción antibacteriana de *Schinus terebinthifolius* Raddi extrae .

Tabla 1. Determinación del pH de los extractos de *Schinus terebinthifolius* en diferentes formas de almacenamiento.

Extractos	pH									
	Tiempo 0 día	Tiempo 7 días	Tiempo 14 días	Tiempo 21 días	Tiempo 28 días	Tiempo 56 días	Tiempo 84 días	Tiempo 112 días	Tiempo 140 días	Tiempo 168 días
NETA	4,18	4,36	4,26	4,38	4,38	4,29	4,31	4,32	4,29	4,57
NEGEL	4,3	4,28	4,27	4,34	4,33	4,26	4,29	4,3	4,24	4,34
NECONG	4,11	4,28	4,17	4,19	4,12	4,15	4,17	4,17	4,17	4,21
ExGEL	4,57	4,58	4,65	4,72	4,67	4,7	4,65	4,66	4,57	4,62
ExCONG	4,45	4,5	4,53	4,58	4,59	4,56	4,57	4,56	4,49	4,59
NELUZ	4,21	4,33	4,41	4,29	4,29	4,23	4,26	4,16	4,16	4,13
ExLIOF	4,13	3,92	3,95	3,97	4,11	4,14	4,21	4,19	4,13	4,19

NETA = No extraído a temperatura ambiente; NEGEL = No extraído, temperatura del refrigerador; NECONG = No extraído temperatura congelación; ExGEL = Extraídas temperatura del refrigerador; ExCONG = Extraído, temperatura congelación; NELUZ = No extraído temperatura ambiental con presencia de luz; ExLIOF. Extraído liofilizado.

Tabla 2. Análisis del modelo de la varianza: (variable dependiente: bacteria)

Variable	GL	SQ	QM	F	P
Almacenamiento	4	19.776	4.9440	4.47	0.0016*
Extracto	1	3.438	3.4377	3.11	0.0789
Tiempo	9	82.676	9.1862	8.30	0.0000*
Bacteria	1	61.241	61.2415	55.34	0.0000*
Residuo	334	369.598	1.1066		
Total	349				

GL: grados de libertad; SQ: suma de los cuadrados; QM: cuadrado medio; F: calculado; *: Diferencia significativa con $p < 0,01$.

Tabla 3 - Prueba de comparación de medias (HSD de Tukey $p < 0,05$) de CBMajustada al tiempo.

Tiempo(días)	Media	Grupos Homogéneos
0	-0.000	B
7	1.413	A
14	1.010	A
21	0.896	A
28	1.685	A
56	1.353	A
84	1.648	A
112	1.401	A
140	1.519	A
168	1.616	A

Tabla 4 - Prueba de comparación de las medias (HSD de Tukey $p < 0,05$) de CBMajustada para el almacenamiento.

Almacenamiento	Media	Grupos Homogéneos
1	1.568	A
2	1.074	B
3	0.998	B
4	1.517	AB
5	1.112	AB

Como la forma de almacenamiento, aunque única diferencia significativa entre los 4 ° C con liofilizado o congelado, hubo una tendencia a dividir en 3 grupos: liofilizados y congelados su mejor resultado en la temperatura ambiente a la luz intermedia y la temperatura ambiente protegido la luz y el frío como una peor evolución (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Los extractos de plantas medicinales deben preservar los diversos componentes activos, este servicio tiene por objeto garantizar la acción farmacológica específica de las especies de plantas, pero las condiciones óptimas de almacenamiento, por ejemplo, esto requiere que la temperatura es un factor muy importante en la conservación de la droga, ya que el calor produce la pérdida de ingredientes activos, lo que favorece el cambio de extracto. Pero pocos informes han sido encontrados en los estudios que evalúan la estabilidad de los productos naturales asociados con la literatura actividad antibacteriana.

Maciel y sus colegas (2006) evaluaron la estabilidad primaria de los tintes de diferentes especies, arnicas *Lychnophora pinaster* y *Arnica montana* L. *rupestris*, a una temperatura de 30 ° C y una humedad relativa del 70% durante 6 meses y parrilla del horno durante 10 meses, para evaluar la similitud entre los preparativos y comprobar los cambios realizados en el tiempo. La calificación de los productos al final del período de almacenamiento mostró que los olores característicos eran menos intenso, el pH disminuyó, disminución de los porcentajes de materia seca y el análisis de cromatografía líquida de alta mostró la degradación de los marcadores químicos. Los resultados del estudio indican una inestabilidad de colorantes evaluado con el tiempo. Estudio de Lima y sus colegas (2005) evaluó el efecto de la luz y la temperatura de congelación de la estabilidad de las antocianinas en madera de cerezo de Surinam, *Eugenia uniflora* L., pulpa congelada se está evaluando a los 0, 2, 4, 6 y 12 meses almacenamiento, y comparando expuesta y protegida de la luz, a través de la absorción de los extractos de la muestra. En las muestras congeladas, una degradación significativa de las antocianinas que sucedió en los primeros 60 días, sin disminución de los niveles de estas sustancias en los meses posteriores. En cuanto a la exposición a la luz se demostró una mayor inestabilidad de extracto de antocianina, extracto de comparación con almacenarse protegidos de la luz.

En otro estudio, Amaral y sus colegas (2009) analizaron el contenido de cumarina en guaco jarabe bajo diferentes temperaturas de almacenamiento, como indicativo de su estabilidad. La cumarina es una sustancia que está relacionada con su actividad anti-inflamatoria y expectorante. El jarabe se prepara y se almacena bajo diferentes condiciones de temperatura, 10 ° C, temperatura ambiente, 37 ° C y 45 ° C durante 5 meses. Los resultados mostraron una variación de contenido - aumentos y disminuciones - en todas las temperaturas ensayadas, adscritos a isomérica precursor de ciclación equilibrio y volatilización. Las cantidades de cumarina variaron de 1,19 mg / ml a 1,37 mg / ml, en función del tiempo y la temperatura.

Souza et al (2006) evaluaron el efecto de los extractos y formulaciones (soluciones antisépticas y jarabes) que contienen guaco con o sin propóleos sobre el crecimiento de *S. mutans* y estabilidad de las soluciones antisépticas. La actividad antibacteriana de los extractos y formulaciones contra *S. mutans* ATCC 25175 se realizó por el método de difusión en agar y posteriormente por la aplicación de este mismo procedimiento, se determinó la estabilidad de las soluciones antisépticas sometidos a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración (8 ° C - 10 ° C) cada mes por un período de tres meses. Extractos Guaco y propóleos y soluciones antisépticas inhibieron el crecimiento de *S. mutans*. En el primer mes, con la excepción de solución antiséptica Guaco 5%, todos los demás inhibieron el crecimiento del microorganismo ensayado. En el segundo mes, sólo soluciones antisépticas que contienen la inhibición bacteriana propóleos producidos. Después de tres meses de almacenamiento, las soluciones que contienen el propóleo, a temperatura ambiente, se mantuvo activa y estable.

En el estudio de Andrade (2011) evaluaron la estabilidad química del extracto de la hierba seca del compañero de estudio verde de largo plazo, en ausencia o en presencia de dióxido de silicio adyuvante. Las cápsulas se almacenaron en un recipiente hermético, a una temperatura de 30 ° C durante 12 meses. En el estudio de estabilidad acelerada, las cápsulas que contienen hierba de extracto seco yerba verde o tostado se mantuvieron bajo condiciones de temperatura de 40 ° C durante seis meses. Para la cuantificación de los compuestos, el extracto seco se disolvió en agua y la concentración de compuestos fenólicos, la clorogénico, y ácidos gálico dicafeoilquínico, la cafeína y teobromina metilxantinas, la capacidad antioxidante total y saponinas totales se monitorizó durante el estudio. En conclusión, el extracto seco de la yerba mate se mantuvo estable durante el período de estudio.

En este estudio los extractos liofilizados almacenados mostraron valores bajos de bactericida mínima (CBM) Concentración frentes probaron los cinco bacterias, y se mantienen estos valores a lo largo del período de 6 meses, lo que indica una excelente actividad antibacteriana del extracto a bajas concentraciones. Esto se puede atribuir debido a la liofilización es un proceso de estabilización, en el que una sustancia es primero desorción congelada y luego la cantidad de disolvente, seguido por la sublimación se reduce, con el fin de garantizar que ningún crecimiento biológico o las reacciones químicas.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones del experimento se puede concluir que no hay influencia del tiempo en la actividad antibacteriana de los extractos durante los seis meses del experimento. Además, la liofilización tendía a ser la mejor forma para el extracto de almacenamiento.

REFERENCIAS

AMARAL, M. P. H.; VIEIRA, F. P.; LEITE, M. N.; AMARAL, L. H.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; PEREIRA, M. C. S.; VAREJAO, E. V. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n 2b, p. 607-611, 2009.

ANDRADE, FERNANDA, **Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva mate**. 105 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Florianópolis, SC, 2011

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L and *Schinus terebinthifolius* Raddi beviess essential oils. **Journal of food Science** v.75, p.466 – 472, 2010.

BRANCO-NETO, M.L.C; RIBAS-FILHO, .JM; MALAFAIA, O; OLIVEIRA-FILHO, M.A; CZECZKO, N.G; AOKI, S. CUNHA, R; FONSECA, V.R; TEIXEIRA, H.M; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em peles de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.21, p.17-22, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2010. p. 545.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciênc. Tecnol. Alim.** Campinas, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.; NASCIMENTO, M.M.; CZECZKO, N.G.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIM, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da aroeira (*Schins terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.2, p.46-51, 2006.

MACIEL, R. L.; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; BRANDAO, M. G. L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Rev. Bras. Farmacogn.** João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 99-104, 2006.

MENDEZ, ANDREAS SEBATHIAN LOUREIRO, **Estudo da estabilidade do antibiótico meropenem**. 246 f. Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, 2007.

NUNES JR, J.A.T.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFIA, O.; CZECZKO, N.G.; INÁCIO, C.M.; NEGRÃO, A.W.; LUCENA, P.L.H.; MOREIRA, H.; WAGENFUHR JR, J.; CRUZ, J.J. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) no processo de cicatrização da línea Alba de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.21, p.8-15, 2006.

OYARZABAL,M.E.B.; SCHUCH,L.F.D.; PRESTES, L.S.P.; SCHIAVON, D.B.A.; RODRIGUES,M.R.A.; MELLO, J.R.B. actividad antimicrobiana de aceite esencial de *origanum vulgare* l. ante bacterias aisladas en leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.** v.16, n.3, p.260-266, 2011.

PRESTES,L.S.; FRASCOLLA,R.; SANTIN, R.; DOS SANTOS M.A.Z.; SCHRAM,R.C.; RODRIGUES, M.R.A.; SCHUCH,L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. **Revista Cubana Plantas Medicinales**. v.13 n.4, 2008.

REIS, S.R., SILVA, N., BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 651-658, 2003.

RIBAS, M.O.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T.A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**. v.21, p.245-252, 2006.

SANTOS, O.J.; RIBAS-FILHO, J.M.; CZECZKO, N.G.; BRANCO NETO, M.L.C.; NAUFEL JR, C.R.; FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, p.39-45, 2006.

SOUZA, D. H.; YAMAMOTO, C. H.; PINHO, J.J. R.G.; ALVES, M. S.; ARAÚJO, A. L. A.; SOUSA, O. V.; Atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata* Sprengel **HU rev, Juiz de Fora**, v.32, n.1, p.11-14, jan./mar.2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Concluí-se que a as variáveis analisadas neste trabalho, como tempo de armazenamento não interferiu na potência da ação antibacteriana do extrato da folha de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente as bactérias relacionadas a mastite bovina. E que o método de liofilização apresentou-se como a melhor forma de armazenamento.

Através desse trabalho, pode-se observar o quanto o conhecimento sobre o método de armazenagem dos fitoterápicos são importantes na manutenção da sua eficácia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. P. H.; VIEIRA, F. P.; LEITE, M. N.; AMARAL, L. H.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; PEREIRA, M. C. S.; VAREJAO, E. V. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n 2b, p. 607-611, 2009.

ANDRADE, FERNANDA. **Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva mate.** 105 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Florianópolis, SC, 2011.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L and *Schinus terebinthifolius* Raddi beviess essential oils. **Journal of food Science** v.75, p.466 – 472, 2010.

BRANCO-NETO, M.L.C; RIBAS-FILHO, .JM; MALAFAIA, O; OLIVEIRA-FILHO, M.A; CZECZKO, N.G; AOKI, S. CUNHA, R; FONSECA, V.R; TEIXEIRA, H.M; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em peles de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.21, p.17-22, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 1 de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Brasília: Ministério da Saúde.

CALIXTO, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33(2): 179-189.

BRASIL 2008, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial da União de 19 de Dezembro de 2008, Seção 1, Página 21, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.agriculturaorganicaamericas.net/Documentos%20Oficiais%20CIAO/Instrucao%20Normativa%20N%C2%BA064.pdf>> Acessado em 23 de janeiro de 2014.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.29, n.3, p. 617-622, maio/jun, 2005.

ENGELKE, F. 2003. **Fitoterápicos e Legislação**. Jornal Brasileiro de fitomedicina 1(1): 10-15.

FACCIN, ÂNGELA, **Atividade antibacteriana in vitro e in vivo de *Schinus terebinthifolius* Raddi no controle da mastite bovina**. 67f Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Veterinária, Pelotas, RS, 2013.

FARIAS, M.R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. Pp. 197-220. In: C.M.O. Simões (ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2010. p. 545.

FRANCO, I.J.& FONTANA, V.L. **Ervas & Plantas: a medicina dos simples**. 9° ed. Livraria Lida Ltda, Erechim, RS. 208p.; 2004.

GUERRA MJM, BARREIRO ML, RODRÍGUEZ ZM, RUBALCABA Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev Cuba Plant Med**. v.5(1):23-25; 2000.

LENZI, M.; ORTH, A.I.Characterization of the functional reproductive system of the pink-pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n.2, p.198-201; 2004.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum; p. 544.; 2002.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.; NASCIMENTO, M.M.; CZECHKO, N.G.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.; CESCHIM, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da aroeira (*Schins terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.2, p.46-51, 2006.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.;NASCIMENTO, M.M.; CZECHKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA-NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; SANTOS, O.J.;CESCHIN, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, 2006; Supl.2: 46-51.

MACIEL, R. L. ; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; LINS BRANDÃO, M. G.; Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. **Rev. bras. farmacogn**. vol.16 no.1 João Pessoa Jan./Mar. 2006.

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A. & ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo

(*Peumus boldus* Molina), patade- vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.).

Revista Brasileira de Farmacognosia 14(2): 111-120; 2004

MING, L.C. 1994. **Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia.**

Horticultura Brasileira 12(1): 3-9.

MITSCHER, L. A.; PILLAI, S.; SHANKEL, D. M. Some transpacific thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. In: NAVARRO-SCHIMIDT, D. **Estudo químico, Biológico e Farmacológico das espécies de *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* para obtenção de frações e moléculas bioativas de potencias terapêutico.** Tese de Doutorado, UFSC, 2005.

MOTA, F.V., GONÇALVES, C.L., SCHUCH, L.F.D., COIMBRA, H.S., HARTWIG, C. Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas com indicativo etnográfico antiséptico/desinfecante. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 3, p. 236-243, 2011.

NUNES JR, J.A.T.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFIA, O.; CZECHKO, N.G.; INÁCIO, C.M.; NEGRÃO, A.W.; LUCENA, P.L.H.; MOREIRA, H.; WAGENFUHR JR, J.; CRUZ, J.J. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) no processo de cicatrização da línea Alba de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, p.8-15, 2006.

OYARZABAL,M.E.B.; SCHUCH,L.F.D.; PRESTES, L.S.P.; SCHIAVON, D.B.A.; RODRIGUES,M.R.A.; MELLO, J.R.B. actividad antimicrobiana de aceite esencial de *origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.16, n.3, p.260-266, 2011.

PRESTES,L.S.; FRASCOLLA,R.; SANTIN, R.; DOS SANTOS' M.A.Z.; SCHRAM,R.C.; RODRIGUES, M.R.A.; SCHUCH,L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. **Revista Cubana Plantas Medicinales**. v.13 n.4, 2008.

REIS, S.R., SILVA, N., BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 651-658, 2003.

RIBAS, M.O.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI., T.A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**. v.21, p.245-252, 2006.

SANTOS, O.J.; RIBAS-FILHO, J.M.; CZECZKO, N.G.; BRANCO NETO, M.L.C.; NAUFEL JR, C.R.; FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, p.39-45, 2006.

SCARLATELLI, F.P. **Mamite ou mastite**. Uberaba : Raca Girolando, 1998.

SCARPA, G.F. Plantas empleadas contra transtornos digestivos em la medicina tradicional criolla del chaco noroccidental.dominguezia, buenos aires. v. 18. p. 36-50. 2002.

SOARES D.G.S., OLIVEIRA C.B, LEAL C., DRUMOND M.R.S., PADILHA W.W.N. Atividade Antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.** ;v.7(3) p.253-7; 2007.

SONAGLIO D, ORTEGA GG, PETROVICK PR, BASSANI VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

TOLEDO ACO, HIRATA LL, BUFFON MCM, MIGUEL MD, MIGUEL OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Ver Lecta**, Bragança Paulista 2003; 21(1/2):7-13.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; DE CARVALHO, M.R.B.; DE LIMA, T.M.A. Influencia da mastite subclínica bovina sobre as frações proteicas do leite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, p. 135-149, 2008.